

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K08943
研究課題名(和文) 腫瘍関連マクロファージ免疫チェックポイント阻害による新規膠芽腫治療法の基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on new glioblastoma treatment by tumor-related macrophage immune checkpoint inhibition

研究代表者
西原 賢在 (Nishihara, Masamitsu)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：20452493
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫内の腫瘍関連マクロファージ(TAM)の浸潤程度は非常に高値であった。また、正常脳と比較してlow grade gliomaではSIRPaの発現量ほぼ同等であり、膠芽腫では発現は低下していた。またCD47の発現も膠芽腫では低下していた。一方、マクロファージにおいてはSIRPaの発現は低下しているものの、CD47の発現は維持された。膠芽腫細胞にSIRPaの抗体を投与したが、有意な抗腫瘍効果は得られなかった。SIRPaの発現が弱い膠芽腫においてはSIRPs抗体単独では不十分の可能性が高く、他の抗体、具体的にはPD1抗体あるいはWT1抗体などの補助抗体が必要であると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫の腫瘍内には多数のM2マクロファージが浸潤しており、独自の免疫環境を構築していることが明らかとなった。一方、膠芽腫の細胞のSIRPaの発現、CD47の発現は正常脳に比較して弱いことが判明した。マクロファージ、膠芽腫細胞のSIRPa-CD47の免疫チェックポイント阻害をSIRPa抗体のみでブロックするだけでは十分な抗腫瘍効果を得ることが出来ない可能性が高く、今後新たな方法を模索する必要がある。

研究成果の概要(英文)：The infiltration of tumor-associated macrophages (TAM) in glioblastoma was very high. In addition, the expression level of SIRPa was almost the same in low grade glioma as compared with normal brain, and the expression level was decreased in glioblastoma. Also, the expression of CD47 was decreased in glioblastoma. On the other hand, in macrophages, the expression of SIRPa was decreased, but the expression of CD47 was seen. SIRPa antibody was administered to glioblastoma cells, but no significant antitumor effect was obtained. In glioblastoma with weak SIRPa expression, anti-SIRPs antibody alone is likely to be insufficient, and other antibodies, specifically co-antibodies such as PD1 antibody or WT1 antibody, may be required.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：腫瘍関連マクロファージ 膠芽腫 SIRPa CD47

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は手術、放射線化学療法などの集学的治療を施行しても、生存期間中央値は約1年半の極めて悪性の脳腫瘍である。膠芽腫の難治性は高度の増殖能、浸潤能や薬剤耐性能、Drug Delivery など様々な要素が影響している。色々な治療法が開発されているが、未だ有効な治療法は無い。

Signal regulatory protein α (SIRP α) は、主に骨髄性細胞の単球、マクロファージ、樹状細胞や神経細胞に発現している SIRP ファミリー由来の制御性膜糖タンパク質の1つで、抑制性レセプターとして働き、膜貫通タンパク質 CD47 と相互作用する。CD47 は細胞外基質タンパクと反応するインテグリン関連タンパク質で、正常細胞は通常 CD47 を細胞表面に提示している。CD47 はいわゆる「Don't me eat」分子であり、SIRP α と CD47 の結合により、宿主細胞食作用のような自然免疫細胞のエフェクター機能がネガティブに制御され、マクロファージの貪食作用が抑制される。

マクロファージの免疫チェックポイント機構である CD47/SIRP α シグナルが働くと、マクロファージの貪食作用が抑制されるため、そのチェックポイントを解除する阻害剤がいくつか開発され、一部臨床試験に進んでいるものもある。これらの治験で使用されている薬剤は殆どが CD47 に対する抗体・阻害薬で、SIRP α に対する阻害薬は殆どない。

連携研究者である村田らは、腎がんや悪性黒色腫などの固形癌の移植マウス実験より、抗 SIRP α 抗体が、マクロファージの SIRP α に結合して CD47 と SIRP α の結合を阻害しマクロファージの貪食抑制(チェックポイント)を解除するのみでなく、抗 SIRP α 抗体ががん細胞の SIRP α にも結合することでマクロファージによるがん細胞の貪食作用を誘導することを示し、抗 SIRP α 抗体による二重の抗腫瘍作用があることを明らかにした。

2. 研究の目的

膠芽腫に浸潤している TAM の性質、そして TAM が膠芽腫の維持、増大・悪性化にどのように寄与しているかを検証する。そして、マクロファージの免疫チェックポイントである SIRP α /CD47 の阻害によって抗腫瘍効果を得られるかを解析する。

3. 研究の方法

(1) TAM の樹立と膠芽腫細胞の共培養による検討

健常人の血液を採取し、CD14+単球(monocyte)を MACS にてソーティングして単離する。単離した CD14+monocyte に M-CSF にてマクロファージに分化させる。その後、膠芽腫培養細胞の培養液を用いてマクロファージを2日間培養させ、TAM を樹立する。TAM の確認には、CD163, CD204, IL-12A, IL-10 の発現状態を real-time PCR, western で確認する。樹立した TAM と膠芽腫の培養細胞(U87)とを共培養、共移植して細胞内の遺伝子発現変化、培養液内サイトカイン、invasion assay, migration assay, 腫瘍組織内のマクロファージ浸潤、マウスの生存期間などを解析。

(2) 膠芽腫培養細胞における SIRP α CD47 発現解析

膠芽腫の培養細胞(U87MG, T98, A172, U251 等)や神戸大学医学部脳神経外科の診療で手術摘出した膠芽腫から樹立した膠芽腫培養細胞における SIRP α , CD47 の発現状態について、western blot, real-time PCR, 免疫染色などで検討する。

(3) 膠芽腫細胞と TAM の共培養での、SIRP α の中和抗体(MY-1)による抗腫瘍効果

上記(1)で樹立した TAM を共培養し、その後 SIRP α 中和抗体(MY-1)を投与して膠芽腫細胞の増殖能、浸潤能、運動能、血管新生能、アポトーシスなどを解析する。また、マクロファージの貪食能、遊走能も解析する。

(4) 膠芽腫、グリオーマ患者髄液を用いた TAM 関連 sCD163 の発現解析

治療前の膠芽腫、グリオーマ患者髄液を用いて、Bio-Plex Pro Human Inflammation Assays kit で髄液中 sCD163 等、マクロファージ関連炎症性メディエーターを測定し、マクロファージの活

性化状態について解析。

4. 研究成果

(1) TAM の樹立と膠芽腫細胞の共培養、共移植による検討

膠芽腫内の TAM の浸潤程度を検証すると、膠芽腫組織内の TAM 浸潤率 (CD163 陽性率) は 4-75% (平均値: $23.6 \pm 18.5\%$) であった。CD163 陽性の TAM は主に壊死や血管の周囲に観察された。CD163 と IL-6 の二重免疫染色では、CD163 陽性 TAM は IL-6 も陽性であった。

M-CSF と U87 培養培地を使用して、末梢単球から TAM 様マクロファージを生成すると、CD163, CD204, IL-10, STAT3 等 TAM のようなマクロファージマーカーを発現した。U87 神経膠腫細胞を TAM 様マクロファージと共培養し、腫瘍上清中のさまざまなサイトカインをサイトカインアレイで分析すると、IL-8, IL6, IL-1, CXCL11 などのサイトカイン、ケモカインの上昇が認められた。共培養して migration assay, invasion assay を行うと、共培養したほうが単培養よりも migration, invasion が上昇した。TAM 様マクロファージと U87 共移植すると、腫瘍の増大速度が上昇し、生存期間が短縮した。また、組織を採取してマクロファージ量を計測すると、CD163 陽性マクロファージ、CD204 陽性マクロファージの量が、TAM を共移植しない腫瘍と比較して有意に上昇していた。また、TAM との共移植腫瘍では STAT3 の発現が上昇していた。また、TAM と共移植した腫瘍では、腫瘍周囲のミクログリアの浸潤が高かった。

(2) 膠芽腫培養細胞における SIRPα CD47 発現解析

グリオーマにおいて SIRPα、CD47 の発現を免疫染色で解析すると、正常脳と比較して低悪性度グリオーマではほぼ同等であり、高悪性度グリオーマ、特に膠芽腫などでは正常脳と比較して SIRPα の発現は低下しており、また CD47 の発現も膠芽腫では低下していた。一方、マクロファージにおいては SIRPα の発現は低下しているものの、CD47 の発現は維持されていた。

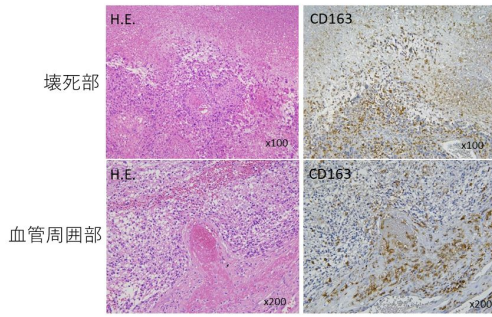
(3) 膠芽腫細胞と TAM の共培養での、SIRPα の中和抗体(MY-1)による抗腫瘍効果

TAM と膠芽腫培養細胞を共培養して、SIRPα の中和抗体(MY-1)による抗腫瘍効果を検討したが、有意な抗腫瘍効果は認めなかった。また、中和抗体によるマクロファージの invasion, migration の状態も有意な差を認めなかった。

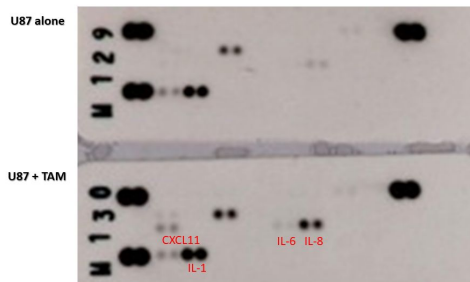
(4) 膠芽腫、グリオーマ患者髄液を用いた TAM 関連 sCD163 の発現解析

グリオーマ 55 例 (膠芽腫 34 例、grade 3 グリオーマ 7 例、grade 2 グリオーマ 10 例、grade 1 グリオーマ 2 例) と脳悪性リンパ腫 24 例で、髄液中の炎症性メディエーターを計測し、悪性リンパ腫に比較してグリオーマで髄液中濃度が有意に上昇していたサイトカインは IL-2, IL-8, IL-12, IL-20, IL-22, MMP1 の 5 つであった。PCNSL で有意に上昇していたものは、IL-10, Osteopontin, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF14, sCD163, MMP2, MMP3, sTNF-R1, sTNF-R2 であった。sCD163 は PCNSL で有意に高値であったが、グリオーマでも検出され、グリオーマの中では膠芽腫(Grade 4)が最も高かった。脳悪性リンパ腫と膠芽腫の腫瘍組織内の CD163 の浸潤量は有意な差を認めなかったため、sCD163 が脳悪性リンパ腫で高値であったのは、IL-10 など様々なサイトカインの影響でマクロファージの活性化がグリオーマでは弱く、脳悪性リンパ腫の方がマクロファージの活性化が亢進しているためと思われた。

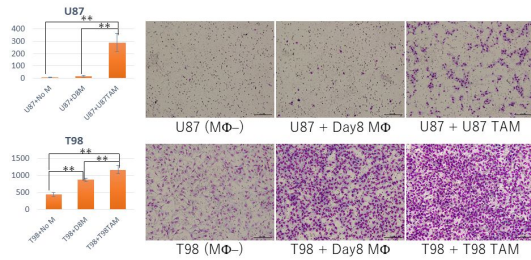
膠芽腫内のTAM



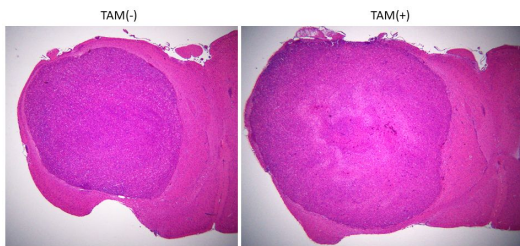
TAMとの共培養による U87細胞培地内サイトカイン変化



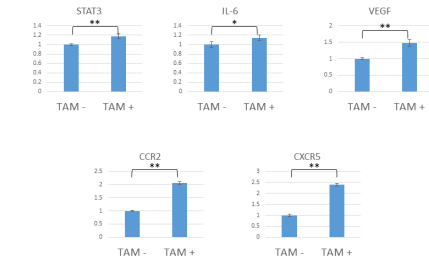
Invasion assay



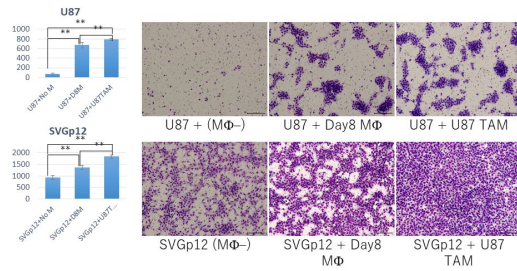
マウス脳への移植実験



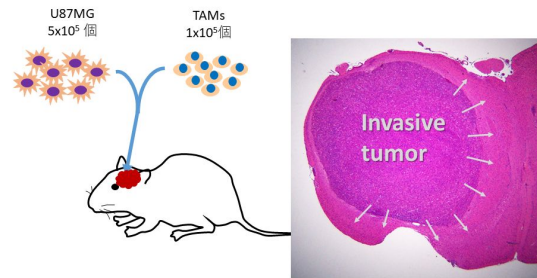
TAMとの共培養による GBM cellでの遺伝子発現変化



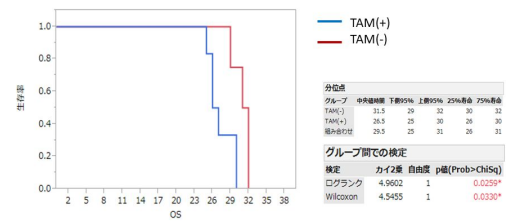
Transwell migration assay



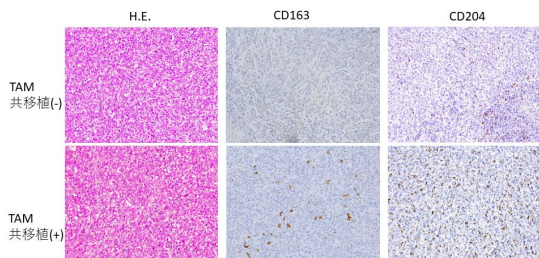
マウス脳への移植実験



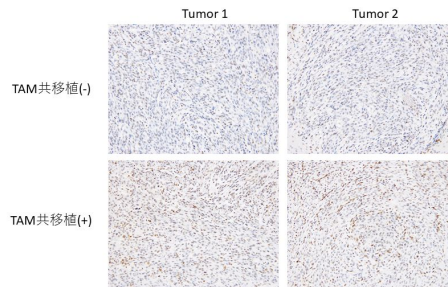
U87とTAMの共移植によるマウス 生存期間解析



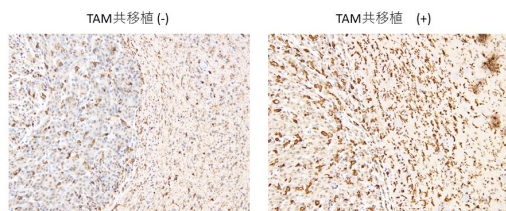
TAMとの共移植によるGBM腫瘍変化



腫瘍内pSTAT3の発現比較

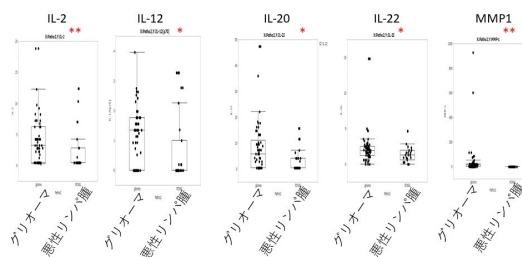


腫瘍周辺の大脳内ミクログリア

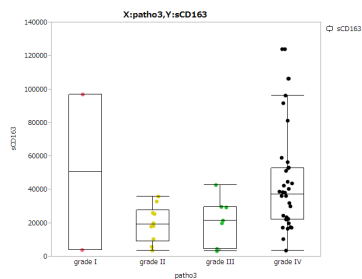


TAMを共移植したU87腫瘍の方が、腫瘍周囲の大脳のミクログリアが多い。

グリオーマで上昇していた髄液中サイトカイン



グリオーマの髄液中sCD163濃度の比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeyama M, Tanaka K, Nishihara M, Irino Y, Shinohara M, Nagashima H, Tanaka H, Nakamizo S, Hashiguchi M, Fujita Y, Kohta M, Kohmura E, Sasayama T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Metabolic changes and anti-tumor effects of a ketogenic diet combined with anti-angiogenic therapy in a glioblastoma mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79465-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeyama M, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Fujita Y, Sekiguchi K, Kohta M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E.	4. 巻 9
2. 論文標題 Multi-marker algorithms based on CXCL13, IL-10, sIL-2 receptor, and 2-microglobulin in cerebrospinal fluid to diagnose CNS lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 4114-4125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maeyama M, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Fujita Y, Sekiguchi K, Kohta M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E.	4. 巻 9
2. 論文標題 Multi-marker algorithms based on CXCL13, IL-10, sIL-2 receptor, and 2-microglobulin in cerebrospinal fluid to diagnose CNS lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 3048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hori T, Sasayama T, Tanaka K, Koma YI, Nishihara M, Tanaka H, Nakamizo S, Nagashima H, Maeyama M, Fujita Y, Yokozaki H, Hirose T, Kohmura E.	4. 巻 68
2. 論文標題 Tumor-associated macrophage related interleukin-6 in cerebrospinal fluid as a prognostic marker for glioblastoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 281-289
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakata J, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Nakada M, Tanaka H, Hashimoto N, Kagawa N, Kinoshita M, Nakamizo S, Maeyama M, Nishihara M, Hosoda K, Kohmura E.	4. 巻 142
2. 論文標題 MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 241-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03113-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Junichi, Sasayama Takashi, Tanaka Kazuhiro, Nagashima Hiroaki, Nakada Mitsutoshi, Tanaka Hiroto, Hashimoto Naoya, Kagawa Naoki, Kinoshita Manabu, Nakamizo Satoshi, Maeyama Masahiro, Nishihara Masamitsu, Hosoda Kohkichi, Kohmura Eiji	4. 巻 142
2. 論文標題 MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03113-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Y, Hosoda K, Imahori T, Tanaka J, Matsuo K, Nakai T, Irino Y, Shinohara M, Sato N, Sasayama T, Tanaka K, Nagashima H, Kohta M, Kohmura E.	4. 巻 1687
2. 論文標題 Pentose phosphate pathway activation via HSP27 phosphorylation by ATM kinase: A putative endogenous antioxidant defense mechanism during cerebral ischemia-reperfusion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res.	6. 最初と最後の頁 82-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohta M, Fujita A, Tanaka J, Sasayama T, Hosoda K, Kohmura E	4. 巻 113
2. 論文標題 Novel Segmentation of Placed Coils in the Treatment of Cavernous Sinus Dural Arteriovenous Fistulas Provides a Reliable Predictor of the Long-Term Outcome in Abducens Nerve Palsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Neurosurg	6. 最初と最後の頁 e38-e44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.01	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura H, Taniguchi M, Hayashi K, Fujimoto Y, Fujita Y, Sasayama T, Tomiyama A, Kohmura E	4. 巻 121
2. 論文標題 Clear Detection of Thin-Walled Regions in Unruptured Cerebral Aneurysms by Using Computational Fluid Dynamics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 e287-e295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.09.098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西原賢在、
2. 発表標題 脳実質内腫瘍摘出術に対する脳溝開放と術前画像評価
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西原 賢在, 武田 直也, 東野 真志, 蘆田 典明, 篠山 隆司, 細田 弘吉, 甲村 英二
2. 発表標題 脳実質内腫瘍に対する脳溝開放を併用した摘出術の手術成績
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蘆田 典明, 武田 直也, 東野 真志, 西原 賢在, 甲村 英二, 細田 弘吉
2. 発表標題 出血源不明のくも膜下出血の特徴と長期予後の検討
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠山隆司、田中一寛、狛雄一郎、前山昌博、藤田祐一、中溝聡、西原賢在、廣瀬隆則、横崎宏、甲村英二
2. 発表標題 膠芽腫内腫瘍関連マクロファージが膠芽腫細胞に与える影響
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠山 隆司 (SASAYAMA TAKASHI) (10379399)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	
研究分担者	田中 一寛 (TANAKA KAZUHIRO) (70467661)	神戸大学・医学研究科・講師 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------